

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2953702号

(45) 発行日 平成11年(1999) 9月27日

(24) 登録日 平成11年(1999) 7月16日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

A 6 1 K 38/16

C 0 7 K 1/107

C 0 7 K 1/107

14/765

14/765

C 0 8 B 37/00

Z

C 0 8 B 37/00

A 6 1 K 37/04

請求項の数 1 (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平1-9648

(22) 出願日

平成1年(1989) 1月20日

(65) 公開番号

特開平2-191601

(43) 公開日

平成2年(1990) 7月27日

審査請求日

平成8年(1996) 1月8日

(73) 特許権者 999999999

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72) 発明者

木全 弘治

愛知県名古屋市中白区植田山1-1404

(72) 発明者

山形 方人

愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21

愛知医科大学分子医科学研究所内

(72) 発明者

鈴木 旺

愛知県名古屋市中東区本郷2-167 シ

ーアイマンション第2本郷A-1004

(74) 代理人

弁理士 津国 肇 (外1名)

審査官 弘實 謙二

(58) 調査した分野 (Int.Cl.⁹, D B 名)

C08B 37/08

C08B 37/00

(54) 【発明の名称】 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン含有する組織癒着防止剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】コンドロイチン硫酸と血清アルブミンとが結合した合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン含有する組織癒着防止剤。

【発明の詳細な説明】

【発明の目的】

(産業上の利用分野)

本発明は、コンドロイチン硫酸と血清アルブミンとを化学的に結合させてなる合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン及びその製造法に関するものである。

(従来の技術及び発明が解決しようとする課題)

コンドロイチン硫酸は、軟骨、気管、皮膚その他の結合支持組織から分離され、医薬、医用材料の原料として利用されている。

しかしながら、生体に広く存在することから予想され

る生理作用に比し、コンドロイチン硫酸について臨床的に認められている薬理効果は少ない。

本発明者らは、コンドロイチン硫酸の薬理作用について鋭意研究を重ねた結果、コンドロイチン硫酸に血清アルブミンを結合せしめることにより、従来コンドロイチン硫酸については認められていない薬理作用が認められることを見出し本発明を完成するに至った。

【発明の構成】

(課題を解決するための手段及び作用)

本発明は、コンドロイチン硫酸と血清アルブミンとを化学的に結合させてなることを特徴とする合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン及びその製造法に関するものである。

本発明に用いるコンドロイチン硫酸としては、特に制限はなく、例えばコンドロイチン-4-硫酸(コンドロ

イチン硫酸A)、コンドロイチン-6-硫酸(コンドロイチン硫酸C)、コンドロイチン-4,6-二硫酸、デルマトン硫酸(コンドロイチン硫酸B)、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、特開昭63-10601号公報記載のコンドロイチン硫酸(ナマコ由来)等が挙げられる。

血清アルブミンとしては、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等が挙げられる。

本発明の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、前述のコンドロイチン硫酸と血清アルブミンを化学的に結合させてなるものであり、かかる結合の様式としては、カルボジイミド縮合法、臭化シアン活性化法(Axen, R. & Ernback, S.; Eur. J. Biochem., 18, 351, 1971)又はプロトン化シッフ塩基に続くイソシアン化合物との反応によるリアレンジメント(Ugi)反応(Axen, R. et al.; Acta Chem. Scand., 25, 1129, 1971)等により得られる共有結合等が挙げられる。

かかる結合手段としては、水系で反応することを求められる物質の結合に適用する水溶性カルボジイミドを用いる方法、多糖類の化学的修飾、活性化を経て酵素蛋白、抗体蛋白、ペプチド等を高分子担体に結合せしめる固定化酵素、アフィニティークロマト担体調製の技術を適用することができる。

カルボジイミド類としては、例えばジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、メチルプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ヘキサメチレンカルボジイミド、ヘプタメチレンカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、メソ-*p*-トリエンスルホネート、1-*t*-ブチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジフェニルイカルボジイミド、4,4'-ジニトロジフェニルカルボジイミド、ジ-*p*-トリルカルボジイミド、ビス(トリメチルシリル)カルボジイミド等が挙げられる。

本発明の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、医薬等に適用するには、水溶性であることが好ましい。

かかる水溶性の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを得るには、該合成プロテオグリカン中にコンドロイチン硫酸含量は1.5~98W/W%の範囲であることが好ましい。

結合に要する縮合剤は、例えば水溶性カルボジイミドによる縮合法では、コンドロイチン硫酸とその0.02~10倍量の血清アルブミンを、水性溶媒に溶解せしめ、pH5付近に調整し、約3~6℃の冷温下、コンドロイチン硫酸に対し0.05~5倍量の水溶性カルボジイミドを添加して反応を行うことにより、本発明の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが得られる。また、臭化シアン活性化法では、使用するコンドロイチン硫酸重量の1/2以

下が好ましい。

合成手法の好ましい態様としては、例えば、臭化シアン活性化法では、コンドロイチン硫酸を水性溶媒を溶解し、臭化シアンを前記割合で5~20%用い、常法により活性化し、得られた活性化コンドロイチン硫酸を低温下アセトニトリル、テトラヒドロフラン等の疎水性溶媒を用い、一旦沈殿分離し、該溶媒で洗浄後、冷水に再溶解し、コンドロイチン硫酸量の1~20倍の血清アルブミン中性緩衝液溶液を用いて結合反応を行うことにより合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが得られる。

以上の結合反応によって得られる合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、常法に従って、透析、アルコール沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー等により精製することができる。

本発明の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、細胞の接着・伸展を促進する作用を有する糖蛋白質フィブロネクチンに対して拮抗性を示し、組織癒着防止剤として有用である。コンドロイチン硫酸、血清アルブミンそれ自体には以上のような効果は認められない。

(発明の実施例)

以下、実施例、試験例により本発明を更に詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら制限するものではない。

実施例1 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの製造(水溶性カルボジイミド縮合法)

クジラ軟骨由来のコンドロイチン硫酸(タイプA)、サメ軟骨由来のコンドロイチン硫酸(タイプC)、デルマトン硫酸(ブタ皮由来;生化学工業(株)製)を水溶性カルボジイミドによる縮合反応によって、ウシ血清アルブミンに結合させた。

前述の各グリコサミノグリカン5mg及びウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)100 μ gを水0.5mlに溶解し、0.1塩酸でpH5.0に調整した。この溶液に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩塩25mgの水0.5ml溶液(pH5.0)を加え、混合物を4℃で12時間攪拌した。混合物を20,000 \times gで10分間遠心し、上澄み液を集め、蒸留水に対して完全に透析した。透析残渣中のグリコサミノグリカン-結合血清アルブミンを凍結乾燥することによって集めた。

合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの物性を以下に示す。

コンドロイチン硫酸(以下「CS」という)(タイプA)由来のプロテオグリカン[合成CS-PG1]

CS/BSA重量比 14.3 (CS 93.5%, BSA 6.5%)

S含量 6.24%

$[\alpha]_D$ -29. (C=1, H₂O)

CS(タイプC)由来のプロテオグリカン[合成CS-PG2]

CS/BSA重量比 14.7 (CS 95.4%, BSA 6.5%)

S含量 6.59%

$[\alpha]_D -14$ ($C=1, H_2O$)

デルマタン硫酸 (以下「DS」という) 由来のプロテオグリカン [合成CS-PG3]

DS/BSA重量比 16.2 (DS 97.2%, BSA 6.0%)

S含量 6.54%

$[\alpha]_D -72.5$ ($C=1, H_2O$)

実施例2 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの製造 (水溶性カルボジイミド縮合法)

ウシ気管軟骨由来のCS (分子量15000) 100mg及びBSA 4mg ($0.67 \mu\text{mole}$) 又は4.4mg ($0.068 \mu\text{mole}$) をそれぞれ水20mlに溶解し、0.1N塩酸でpH5.0に調整後、氷冷下—エチル—3— (3—ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩各7.7mg ($40 \mu\text{mole}$) を加えた。この混合物を各々4℃で12時間攪拌した後、 $20,000 \times g$ で20分間遠心し、上澄み液を集め、蒸留水に対して透析した。透析液を0.1M食塩を含む0.04Mトリス鉛管緩衝液 (pH7.4) で平衡化したDEAE・セルロフアインカラム (1.5×5.6cm) にアプライし吸着させた。同緩衝液100mlで洗浄して未反応のBSAを除去した後、0.1Mから1.0Mの食塩を含む緩衝液各200mlの直線濃度勾配により溶出した。求め

る画分を集め、透析し、エタノールを加え沈殿させ、沈殿をエタノールで洗浄後、再び水を加えて凍結乾燥することによりCS—BSA結合物をそれぞれ78.7mg及び69.4mg得た。BSA44mg使用系の生成物を [合成CS—PG4] とし、BSA4.4mg使用系の生成物を [合成CS—PG5] とした。

CS/BSA重量比

BSA使用量 44mg 4.2 (CS 80.9%, BSA 19.1%)

4.4mg 14.0 (CS 93.3%, BSA 6.7%)

S含量

BSA使用量 44mg 6.38%

4.4mg 6.77%

$[\alpha]_D$

BSA使用量 44mg -20 ($C=1, H_2O$)

4.4mg -14 ($C=1, H_2O$)

実施例3 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの製造 (水溶性カルボジイミド縮合法)

実施例1に準じて、サメ軟骨由来のCS (分子量30000; タイプC)、クジラ軟骨由来のCS (分子量35000; タイプA) から、下記の比率で合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを調製した。

表 1

タイプ	反応比率 (mg)				収量 (mg)
	C	S	BSA	WSC	
C	100		10	2.9	92
A	100		10	2.9	90

CSタイプC由来の生成物を [合成CS—PG6] とし、CSタイプA由来の生成物を [合成CS—PG7] とした。得られた生成物の物性を以下に示す。

[合成CS—PG6]

CS/BSA重量比 10.0 (CS 90.9%, BSA 9.1%)

S含量 6.64%

$[\alpha]_D -15.6$ ($C=1, H_2O$)

[合成CS—PG7]

CS/BSA重量比 8.8 (CS 89.8%, BSA 10.2%)

S含量 6.62%

$[\alpha]_D -16.0$ ($C=1, H_2O$)

実施例4 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの製造 (臭化シアン活性化法)

クジラ軟骨由来のCS1.0g及びBSA0.1gを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液100mlに溶解し、臭化シアン0.2gを加えて4℃で17時間反応させた。反応液にエタノールアミン0.1mlを加えて室温で2時間反応後、0.1N塩酸でpH7.0

として、流水中で2時間透析した。透析内液にエタノールを加えて沈殿させ、沈殿物を遠心で集めてエタノールで洗浄した乾燥させた。得られた白色沈殿物 [合成CS—PG8] の物性を以下に示す。

CS/BSA重量比 10.3 (CS 92.1%, BSA 8.9%)

S含量 6.8%

$[\alpha]_D -15.5$ ($C=1, H_2O$)

実施例5 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカン製造 (臭化シアン活性化法)

サメ軟骨由来のCS1.0gを5Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 11.9) に溶解し、4℃に冷却した後、臭化シアンのアセトニトリル溶液 (100mg/ml) 2mlを加えて10分間反応させた。次いで、反応液の5倍量のアセトニトリルを加えて沈殿物を得た。沈殿物をアセトニトリルで十分に洗浄し、速やかに0.1M炭酸水素ナトリウム溶液に溶解した。この水溶液にBSA水溶液 (0.15g/100ml) を加えて4℃で17時間反応させた。反応液にエタノールアミン0.1mlを

加えて室温で2時間反応し、0.1N塩酸でpH7.0として後、エタノールを加えて沈殿させ、沈殿物を遠心で集めてエタノールで洗浄して乾燥させた。得られた白色沈殿物【合成CS-PG9】の物性を以下に示す。

CS/BSA重量比 7.0 (CS 87.%, BSA 12.6%)

S含量 6.6%

$[\alpha]_D -17$ (C=1, H₂O)

実施例6 合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの製造(水溶性カルボジイミド縮合法)

ブタ皮由来のCS(タイプB) 50mg及びヒト血清アルブミン(以下「HSA」という) 22mgを水10mlに溶解し、0.1N塩酸でpH5.0に調整後、氷冷下1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩7.7mg(40 μ mole)を加えた。この混合物を4℃で12時間攪拌した後、20,000×gで20分間遠心し、上澄み液を集め、蒸留水に対して透析した。透析液を0.1M食塩を含む0.04Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したDEAE・セルロファインカラム(1.5×5.6cm)にアプライし吸着させた。同緩衝液100mlで洗浄して未反応のHSAを除去した後、0.1Mから1.0Mの食塩を含む緩衝液各200mlの直線濃度勾配により溶出した。求める画分を集め、透析し、凍結乾燥することによりCS(タイプB)-HSA結合物【合成CS-PG10】35.9mgを得た。

CS/HSA重量比 3.9 (CS 79.6%, HSA 20.4%)

S含量 6.2%

$[\alpha]_D -58$ (C=1, H₂O)

試験例1 フィブロネクチンを予め塗布した培養皿に塗布した合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのBHK細胞の接着に対する効果

96穴培養皿をヒト血漿フィブロネクチン5 μ g/mlで塗布した後、実施例1で得た各種合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを第1図に示す各濃度で塗布した。

別に、100mm径の培養皿に集密状態になるまで培養したBHK細胞(新生ハムスター腎細胞)と0.1mg/mlの濃度のトリプシン5mlを加え、37℃で5分間処理した。次いで、1mg/mlの大豆トリプシンインヒビター5mlを加え、トリプシンを不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。

細胞はトリプシンインヒビターを含む溶液で2回洗浄

後、単一細胞懸濁液として、細胞数をカウントした。

得られた単一細胞懸濁液100 μ l (1×10⁴個細胞)を、前記フィブロネクチンと合成プロテオグリカンを塗布した培養皿に加え、37℃で2時間処理した。接着しなかった細胞を洗除した後、接着した細胞を2%ホルムアルデヒドで固定し1%トルイジンブルーで染色して、その細胞数をカウントした。

結果を第1図に示す。第1図において、(●)は【合成CS-PG1】の、(○)は【合成CS-PG2】の、(△)は【合成CS-PG3】の、各濃度における細胞接着の変動を示す。値は、2回の測定の平均を表す。

第1図から、本発明の合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、フィブロネクチンの細胞接着促進作用を阻害することがわかる。

なお、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとともにインキュベートしたコンドロイチン硫酸Cで培養皿を同様に処理した対照では、細胞接着は認められなかった。

試験例2 各種培養細胞の細胞接着物質に対する合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの接着阻害効果

(1) BHK21細胞と細胞接着物質に対する効果

実施例2で得た合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンについて、BHK21細胞(新生ハムスター腎細胞)とフィブロネクチン、ラミニン、I型コラーゲン及びビトロネクチンとの接着に対する阻害効果を検討した。

各5 μ g/mlのヒト血漿フィブロネクチン、マウスEHS腫瘍細胞由来ラミニン、ラット腱由来I型コラーゲン及びウシ血清ビトロネクチンをそれぞれ96穴培養皿に塗布し、試験例1と同様にして、合成コンドロイチン硫酸(タイプA)プロテオグリカンを塗布した後、BHK21細胞の単一細胞懸濁液100 μ lを加え、細胞接着の変動を見た。対照として合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを処理しないものを用いた。結果を表2に示す。

なお、表中で相対接着細胞数として、全くあるいは殆ど細胞接着しなかった場合を-、10~20%の細胞が接着した場合を+、70~80%の細胞が接着した場合を++++、90~100%の細胞が接着した場合を+++++と半定量的に表した。

表 2

基盤成分	相対接着細胞数 / 培養器 (プレート)		
	対 照	処 理	
		CS-PG4	CS-PG5
フィブロネクチン	+	—	—
ラミニン	+	—	—
コラーゲン	+	—	—
ビトロネクチン	+	—	—

(2) CEF細胞と細胞接着物質に対する効果

実施例3で得た合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンについて、CEF細胞（ニワトリ胚繊維芽細胞）とヒト血漿フィブロネクチン、EHS腫瘍マウスラミニン、ラ

ット鍵I型コラーゲン及びウシ血清ビトロネクチンとの接着に対する阻害効果を検討した。

処理方法及び測定法は(1)と同様に行った。結果を表3に示す。

表 3

基盤成分	相対接着細胞数 / 培養器 (プレート)		
	対 照	処 理	
		CS-PG6	CS-PG7
フィブロネクチン	+	—	—
ラミニン	+	—	—
コラーゲン	+	—	—
ビトロネクチン	+	—	—

(3) CHO-K1細胞と細胞接着物質に対する効果

実施例4、5で得た合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンについて、CHO-K1細胞（チャイニーズハムスター細胞）とヒト血漿フィブロネクチン及びEHS腫瘍マ

ウスラミニンとの接着に対する阻害効果を検討した。

処理方法及び測定法は(1)と同様に行った。結果を表4に示す。

表 4

基盤成分	相対接着細胞数 / 培養器 (プレート)		
	対 照	処 理	
		CS-PG8	CS-PG9
フィブロネクチン	+	—	—
ラミニン	+	—	—

(4) B16F10細胞と細胞接着物質に対する効果

実施例6で得た合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンについて、B16F10細胞（高転移性メラノーマ細胞）とヒト血漿フィブロネクチン及びEHS腫瘍マウスラミニ

ンとの接着に対する阻害効果を検討した。

処理方法及び測定法は(1)と同様に行った。結果を表5に示す。

表 5

基盤成分	相対接着細胞数 / 培養器 (プレート)	
	対 照	処 理
フィブロネクチン	+++++	-
ラミニン	+++	-

【発明の効果】

本発明によれば、フィブロネクチンの細胞接着促進作用を阻害し、組織癒着防止剤として有用な合成コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

第1図は、グリコサミノグリカン-結合血清アルブミンについての各濃度における細胞接着の変動を示す図である。

【第1図】

